



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**“RELACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA
INTESTINAL Y EL AUTISMO (II)”**

Autor/a: Irene Sáiz Bueno

Tutor: Jose Manuel Rodríguez Peña

Convocatoria: Junio de 2017

ÍNDICE

1. Resumen.....	pág. 3
2. Introducción y Antecedentes.....	pág. 3
3. Objetivos.....	pág. 8
4. Metodología.....	pág. 8
5. Resultados y discusión.....	pág. 8
6. Conclusiones.....	pág. 17
7. Bibliografía.....	pág. 18

1. RESUMEN

El trastorno del espectro autista (TEA) es un desorden del neurodesarrollo muy importante, sin embargo los mecanismos y manifestaciones de esta enfermedad siguen siendo bastante desconocidos.

Si bien el TEA se diagnostica por la presencia de comunicación social alterada y el comportamiento repetitivo y estereotipado, también existen comorbilidades comunes como la desregulación inmune y los problemas gastrointestinales. Los vínculos entre ciertos componentes de la microbiota intestinal y fenotipos relevantes para el TEA, plantean la cuestión de si la disbiosis microbiana a nivel intestinal desempeña un papel en el desarrollo o la presencia de síntomas del TEA.

El microbioma intestinal en humanos alberga una comunidad compleja de microorganismos que influyen profundamente en muchos aspectos del crecimiento y el desarrollo, incluyendo el desarrollo del sistema nervioso. En esta revisión se presentan las evidencias científicas más aceptadas sobre la composición del microbioma del intestino humano, así como las interacciones potenciales entre el microbioma y el autismo. Se considera la investigación sobre patrones atípicos de alimentación y nutrición en TEA, y como podrían interactuar con el microbioma, a través de estudios realizados en roedores. Además la comprensión más profunda de esta interacción puede ayudar al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para este trastorno.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las poblaciones de microorganismos residen en todas las superficies del cuerpo humano expuestas al medio ambiente, incluyendo piel, boca, cavidad nasal y vagina, pero es en el intestino donde se encuentra la comunidad más abundante y diversa (1).

El microbioma del intestino distal se analiza a través de las heces, constituyendo una técnica no invasiva de muestreo, y ha proporcionado importantes datos sobre la composición y función del microbioma intestinal distal. Sin embargo es importante reconocer que la microbiota residente en las superficies de la mucosa intestinal puede ser diferente de la presente en materia fecal. El estudio de las especies adherentes de la mucosa intestinal supone técnicas invasivas, caras e impracticables en estudios de

investigación a gran escala. Aun así, se puede obtener bastante información a partir de la secuenciación genómica de restos fecales de forma no invasiva. (1).

Composición del microbioma intestinal

El análisis metagenómico ha confirmado la presencia de bacterias como principal componente de las heces. El microbioma intestinal está compuesto en su mayoría por bacterias pertenecientes a dos filos, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, seguido de los filos; *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (Fig. 1A).

Además, el análisis bioinformático de las especies bacterianas identificadas, realizando un análisis multidimensional de conglomerados y de Componentes Principales (PCA), revelaron tres grupos globales de microbiota distintos designados como “enterotipos” (2). Cada uno de estos tres enterotipos se caracteriza por la mayor abundancia relativa en los niveles de los siguientes géneros: *Bacteroides* (enterotipo 1), *Prevotella* (enterotipo 2) y *Ruminococcus* (enterotipo 3) (Fig. 1B).

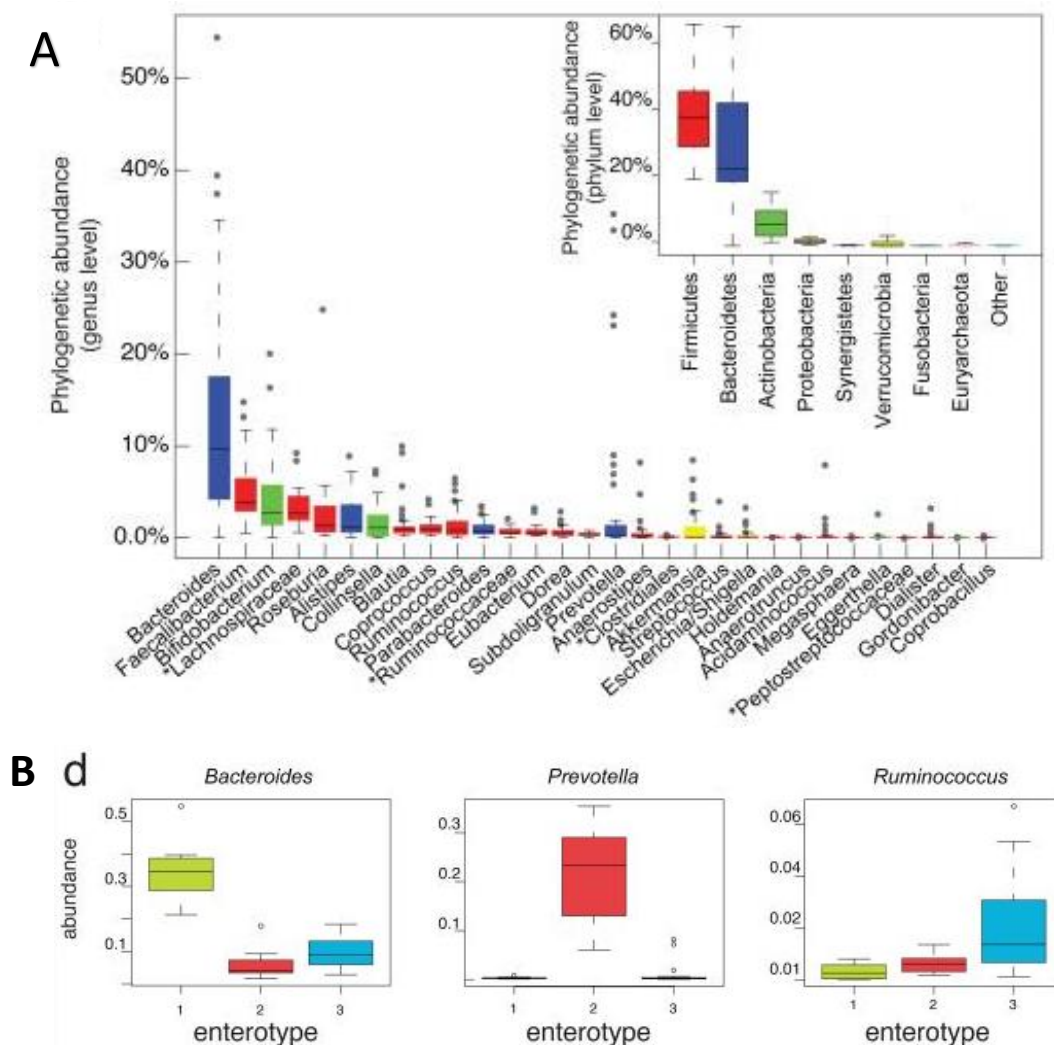


Figura 1. a) Los 30 géneros y filos más abundantes encontrados en el intestino del ser humano b) Abundancia de los principales géneros bacterianos que definen cada enterotipo. Tomada de (2).

Los tres enterotipos no solo implican diferencias filogenéticas, también funcionales. El **enterotipo 1**, integrado en su mayoría por el género *Bacteroides*, obtiene energía principalmente de carbohidratos y proteínas a través de la fermentación, ya que los genes que codifican enzimas involucradas en la degradación de estos sustratos (galactosidasas, hexosaminidasas y proteasas). También participan en la glucólisis y en la vía de las pentosas fosfato. En cuanto al **enterotipo 2**, enriquecido en el género *Prevotella*, que actúa en sinergia con *Desulfovibrio*, mediante la desulfatación, para degradar las glucoproteínas de la mucina presente en la mucosa intestinal. Por último en el **enterotipo 3** el género *Ruminococcus* es el más frecuente, encontrándose incrementada también la presencia de *Akkermansia*, ambos géneros son capaces de degradar las mucinas. A su vez, está dotado de transportadores de membrana (en su mayoría azúcares), lo que da lugar a la hidrólisis de la mucina, así como la captación de azúcares simples resultantes por estos géneros. (2)

Se ha demostrado que los enterotipos dependen de la ingesta dietética a largo plazo, permaneciendo estables hasta 10 días, sin cambiar el tipo de ingesta (3). Por ejemplo, el tipo de dieta llevada a cabo por niños europeos, siendo una dieta occidental típica rica en proteínas y grasas animales es comparado con niños de Burkina Faso, que ingieren dietas ricas en carbohidratos con bajo contenido en proteínas animales. El microbioma europeo estaba dominado por taxones típicos del enterotipo *Bacteroides*, mientras que el microbioma africano estaba dominado por el enterotipo *Prevotella*. (3)

Además de la dieta, la edad y otros factores ambientales, es muy probable que la genética juegue un papel importante en el mantenimiento y establecimiento del enterotipo. (1)

Como muestra de la importancia de la microbiota intestinal, en un estudio, a través de la secuenciación metagenómica de muestras fecales de 124 individuos, se ha podido estimar que el número de genes microbianos diferentes era de 3,3 millones (4). Para poner esto en un contexto, se cree que todo el genoma humano contiene aproximadamente 30000 genes codificantes de proteínas. Por lo tanto, el cuerpo humano alberga genes funcionales que complementan nuestra biología (1).

Funciones del microbioma intestinal

- Funciones metabólicas: La microbiota entérica metaboliza los sustratos o residuos dietéticos no digeribles, el moco entérico y los detritus celulares (4).

El complemento genético colectivo del microbioma intestinal es 150 veces mayor que el genoma humano (5). En base a esto, es sabido que el genoma humano carece de enzimas para degradar muchos polisacáridos vegetales como pectina, arabinosa y xilano, en contraste con el microbioma del intestino distal que contiene más de 80 familias de glucosidasas diferentes (6).

La fermentación de hidratos de carbono no digeribles por el huésped constituye una fuente de energía importante para la proliferación bacteriana, de hecho, se ha estimado que hasta un 10 % de calorías presentes en la dieta occidental provienen de la fermentación microbiana de carbohidratos (1). También produce ácidos grasos de cadena corta que el humano puede absorber, recuperando energía y favoreciendo la absorción de iones (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) en el ciego. Además, las funciones metabólicas incluyen la producción de vitaminas (K, B₁₂, biotina, ácido fólico y pantoténico), así como la síntesis de aminoácidos a partir de amoníaco o urea (4).

El metabolismo anaerobio de péptidos y proteínas (putrefacción) se produce en segmentos más distales del colon y también es fuente de ácidos grasos de cadena corta, pero al mismo tiempo genera una serie de sustancias potencialmente tóxicas incluyendo amoníaco, aminas, fenoles, índoles (4).

- Funciones protectoras: La función defensiva de la microbiota incluye el efecto “barrera”, por el que las bacterias ocupan un nicho ecológico impidiendo la implantación de bacterias extrañas al ecosistema. Este efecto “barrera” se da por la capacidad de ciertas bacterias de segregar sustancias antimicrobianas capaces de inhibir la polifерación de otras bacterias, evitando así la competición por los recursos del sistema. Además la microbiota impide el sobrecrecimiento de bacterias oportunistas que están presentes en el intestino pero con proliferación restringida. El equilibrio entre especies bacterianas residentes confiere estabilidad al conjunto de la población microbiana (4).

- Desarrollo inmunológico: El microbioma intestinal también puede servir como clave del desarrollo inmunológico. Existe una compleja interacción entre la mucosa gastrointestinal y la microbiota comensal, mediada en gran parte por los componentes del sistema inmune innato (7).

El sistema inmunitario intestinal es capaz de tolerar las bacterias beneficiosas a la vez que lleva a cabo una respuesta inmune frente a especies patógenas (8). No se sabe muy bien como han logrado esto, pero es muy probable que las bacterias simbióticas hayan evolucionado para sobrevivir a las condiciones del lumen intestinal, acumulando funciones que permitan la coexistencia con el sistema inmune del huésped (1). Existen datos que apoyan esta hipótesis, aportando papeles definidos para especies bacterianas específicas, como por ejemplo la fuerte influencia de bacterias filamentosas segmentadas (SFB), una especie relacionada con *Clostridium*, en las células T intestinales de ratones. Sin la presencia de SFB, las células T intestinales no son capaces de desarrollarse (9). También se ha demostrado en ratones que la exposición a un polisacárido específico producido por *Bacteroides fragilis* interactúa con el sistema inmune del huésped para inducir el desarrollo adecuado de células T, corregir los desequilibrios Th1 / Th2 y dirigir el desarrollo adecuado del bazo y otros tejidos linfoides secundarios (10).

Por tanto, algunas anomalías en el desarrollo del sistema inmune podrían deberse a defectos en la interacción de la microbiota con los compartimentos inmuno-competentes de la mucosa.

TEA y comorbilidades médicas

El trastorno del espectro autista, es una disfunción del desarrollo neurológico caracterizado por la mala comunicación social y los comportamientos repetitivos que se combinan con varias comorbilidades médicas como las convulsiones, ansiedad, falta de sueño y alteraciones metabólicas (11).

Las causas exactas del TEA no se conocen pero se cree que implican una combinación de factores de riesgo ambientales y factores genéticos. Las mutaciones de *novo* en las células germinales de los padres y los polimorfismos de nucleótidos cortos, en secuencias del genoma implicadas en el desarrollo de autismo, son causantes del 50 % del trastorno (12).

El estudio post mortem de cerebros de pacientes autistas han permitido determinar:

- Mayor activación de la microglia y astrogliosis en el cerebelo y la corteza cerebral, junto con un aumento de citocinas proinflamatorias en el líquido cefalorraquídeo y regiones corticales del cerebro (13).
- Genes asociados al TEA que codifican características del sistema inmunológico. Las mutaciones en estos genes están vinculadas con el fenotipo de TEA, que incluyen pérdida de conectividad estructural y funcional de regiones cerebrales importantes (11).

Es destacable que estudios paralelos revelen mayor prevalencia de trastornos y alteraciones gastrointestinales en las poblaciones con TEA en comparación con los controles. Entre estos síntomas gastrointestinales se incluyen: diarrea, estreñimiento, reflujo gástrico, deficiente integridad del epitelio gastrointestinal y aumento de la permeabilidad intestinal (14). Además, existen datos experimentales en animales que revelan los efectos del microbioma sobre la inmunidad, el cerebro y el comportamiento. Por todo ello, se puede considerar al microbioma como un instrumento importante para la comprensión de la disfunción inmune y gastrointestinal en subgrupos de individuos autistas (11).

3. OBJETIVOS

Revisión bibliográfica de los resultados obtenidos en la relación del microbioma intestinal humano con el trastorno de espectro autista. Este estudio se basa principalmente en la comparación del microbioma intestinal de niños neurotípicos con el de niños autistas. Además se estudia la dieta en ratones durante el embarazo y cómo esto puede afectar al desarrollo de trastornos neurológicos semejantes al autismo en la descendencia, así como los futuros tratamientos posibles para el TEA.

4. METODOLOGÍA

Búsqueda bibliográfica de artículos en bases de datos informatizadas como Pubmed y Scielo, además de revisión de revistas científicas como Cell.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Comparación del microbioma intestinal en niños autistas frente al de niños neurotípicos**

A menudo se ha expuesto que los niños con autismo tienen problemas gastrointestinales más frecuentes y graves que niños de la población general (15).

Se han llevado a cabo una serie de estudios que comparan estos dos tipos de microbioma intestinal:

Un estudio realizado en la universidad de Arizona, reclutó 20 niños neurotípicos y 20 niños con TEA. Los sujetos estudiados tenían edades comprendidas entre los 3 y los 16 años, los cuales no tomaron ningún tipo de antibiótico o antimicótico durante el mes antes de la recogida de muestras (16).

Los niños con TEA fueron evaluados a partir de diferentes test;

- Entrevista para el diagnóstico de autismo (ADI-R) (16).
- Lista de evaluación de tratamientos para el autismo (ATEC): Dividido en cuatro subclases: 1) Discurso / lenguaje / comunicación, 2) Sociabilidad, 3) Capacidad sensorial / cognitiva, y 4) Salud / comportamiento físico. Es la suma de las puntuaciones de cada subclase (16).
- Escala de observación para el diagnóstico de autismo (ADOS): Basado en comunicación, social, juego / imaginación, creatividad y comportamiento (16).
- *Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory* (PDD-BI): Está basado en la puntuación que se obtuvo de las siguientes subcategorías: 1) Enfoque sensorial/perceptivo, 2) Rituales/resistencia al cambio, y 3) Problemas sociales pragmáticos (16).

También se llevaron a cabo encuestas con el fin de recoger algunos patrones sobre la dieta, tales como: dieta libre de gluten/ caseína (GF/GD), uso de probióticos, consumo de mariscos y uso de suplementos nutricionales como vitaminas y calcio (Tabla 1).

Se tomaron muestras fecales y se procedió a la pirosecuenciación de las regiones V2/V3 en el ADNr 16S bacteriano para la comparación del microbioma intestinal entre sujetos neurotípicos y autistas (n=20 cada uno), con edades comprendidas entre $8,3 \pm 4,4$ y $6,7 \pm 2,7$ años respectivamente. Para estimar la gravedad de los síntomas gastrointestinales, se dieron 6 categorías de índice de gravedad (6-GSI) (Tabla 1).

Subject characteristic	Neurotypical	Autistic
Total # participants	20	20
Male/Female	17/3	18/2
Age (years)	8,3 ± 4,4	6,7 ± 2,7
ADOS	–	12,7 ± 3,9
ATEC	–	71,5 ± 23,4
PDD-BI	–	52,8 ± 50,0
6-GSI	0,5 ± 0,8	4,7 ± 2,3
# of subjects using GF/CF diet	1	5
# of subjects using nutritional supplements	8	13
Probiotics (per week)	1,6 ± 2,6	3,3 ± 3,4
Seafood (per week)	0,4 ± 0,5	1,2 ± 2,3

Tabla 1. Resumen de las características de los sujetos a estudio, incluyendo patología gastrointestinal, índices de autismo y características dietéticas. Tomada de (16).

Cuando se comparó la gravedad de de los problemas gastrointestinales con la gravedad del autismo, las puntuaciones de 6-GSI no tuvieron fuertes correlaciones con ningún índice de síntomas autistas, incluyendo el ADOS (coeficiente de correlación de Pearson / Spearman $r = -0,33 / 0,28$), el ATEC ($r = 0,25 / 0,26$), y el PDD-BI ($r = 0,15 / 0,09$) (16).

Mantener la riqueza y diversidad bacterianas es importante para proporcionar a la microbiota intestinal una buena funcionalidad y adaptabilidad ante los cambios ambientales (6). Con un total de 987.801 secuencias clasificadas se llevaron a cabo 15.991 lecturas con el fin de estimar la riqueza y diversidad bacterianas. Se vió que los individuos neurotípicos tienen mayor número de especies bacterianas que los individuos autistas, en base al número de OTUs (Unidad Taxonómica Operativa) identificadas, como se observa en la (Figura 2).

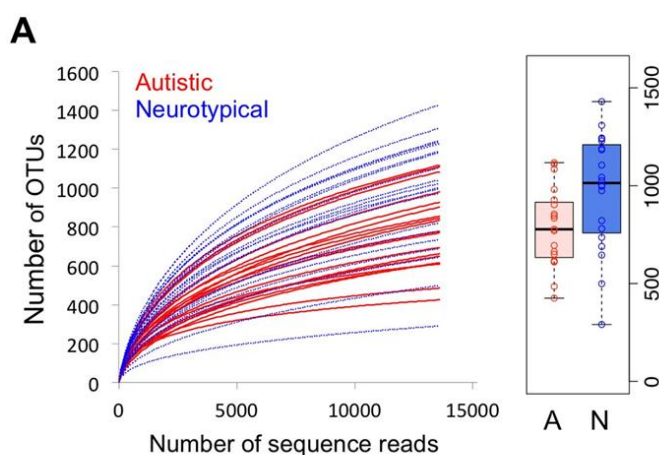
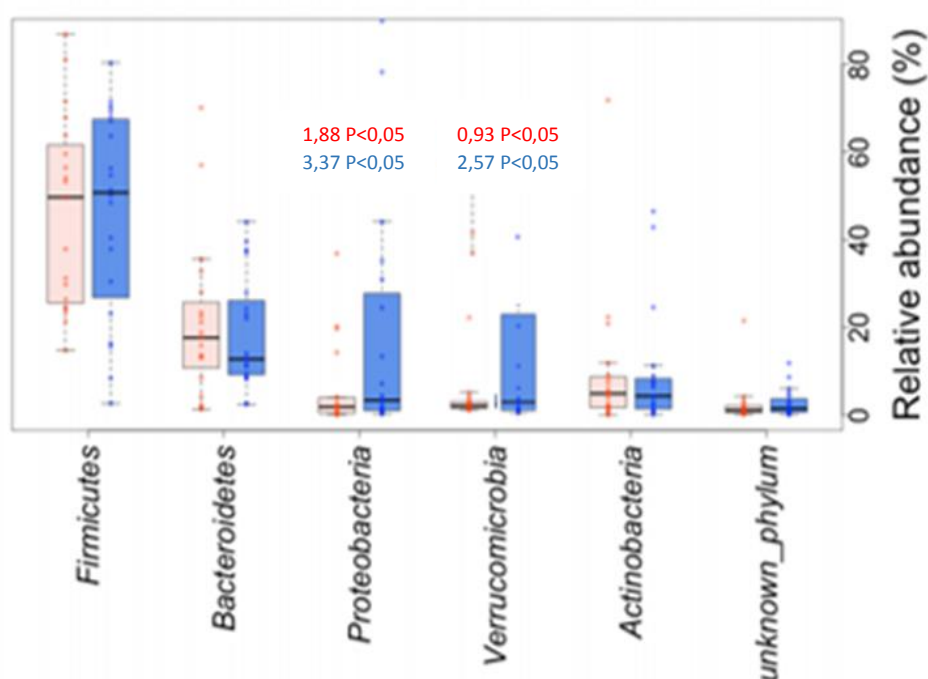


Figura 2. Comparación de diversidad bacteriana en intestino entre niños neurotípicos y autistas. Gráfica que representa el número de OTU (Unidad Taxonómica Operativa) en función del número de secuencias leídas. Tomada de (16).

Para los análisis taxonómicos detallados, las secuencias individuales fueron clasificadas por el software RDP (*Remote Desktop Protocol*) (17). Se asignó aproximadamente el 97% de las secuencias totales a 15 filos conocidos; *Firmicutes* y *Bacteroidetes* fueron los dos filos dominantes, como se informó en estudios anteriores (2). *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, y *Actinobacteria* también fueron relativamente abundantes Fig.3. Estos cinco filos comprendieron un promedio de 97,2% del total de secuencias clasificadas a través de las muestras. La comparación de las abundancias medias entre ambos grupos mediante la prueba t de Student demostró que los filos *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* fueron más comunes en los grupos neurotípicos que en los autistas (16).



Frigura 3.) La abundancia relativa del microbioma del intestino a nivel de filos. Cajas rojas: niños autistas/ Cajas azules: niños neurotípicos. Tomada de (16).

De los 214 géneros identificados, los 5 más abundantes fueron: *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia* y *Subdoligranulum*. Estos cinco géneros constituyeron el 40% y 56% de las secuencias totales, respectivamente (Fig 4A). Curiosamente, el género *Akkermansia* estuvo presente en niveles muy altos en varios sujetos autistas, representando hasta el 59% de todas las secuencias. El hecho de que este

género se encuentre incrementado, contribuye a una menor diversidad microbiológica en las muestras de niños autistas (16).

La abundancia media de cada género se comparó entre los grupos mediante la prueba t de student y la prueba de Mann-Whitney. Estas pruebas demostraron que la familia *Veillonellaceae* (con género desconocido) y el género *Prevotella* fueron significativamente más abundantes en el grupo neurotípico que en el autista (Fig 4B). Además, la abundancia de *Coprococcus* también fue mayor en muestras neurotípicas, mientras que por el contrario el género *Lactobacillus* fue ligeramente superior en muestras autistas que en neurotípicos (Fig. 4B). Se verificaron los resultados de *Prevotella* mediante qPCR, confirmando una menor abundancia de esta en niños autistas (Fig. 4C). A continuación con el fin de medir la abundancia relativa de cada género se empleó la curva ROC (Característica operativa del receptor), comúnmente utilizada para evaluar la clasificación de potenciales biomarcadores. Se evalúan midiendo el AUC (el área bajo la curva) que representa tasas verdaderas frente a falsas positivas, donde un valor de AUC de 0,5 corresponde a una clasificación aleatoria y un valor de 1,0 corresponde a una clasificación perfecta. Los géneros mencionados anteriormente (*Veillonellaceae*, *Prevotella* y *Coprococcus* junto con *Lactobacillus*) mostraron los valores de AUC más altos entre todos los géneros, hasta 0,829 (Fig 4D).

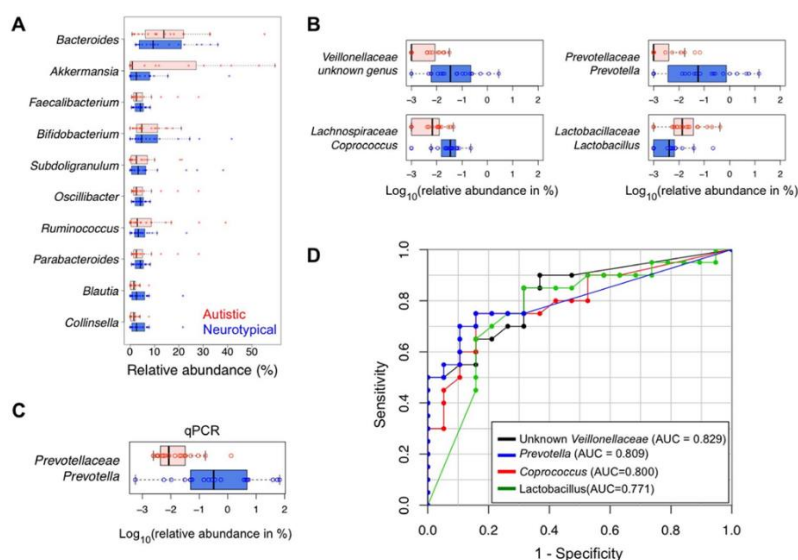


Figura 4. Distribución de 40 sujetos basándose en la abundancia relativa. Cajas rojas: niños autistas/ Cajas azules: niños neurotípicos A) Los 10 géneros más abundantes. B) Los 4 géneros diferenciados más abundantes. C) El género *Prevotella* obtenido por

análisis qPCR, y D) Característica operativa del receptor (ROC) de los 4 géneros que tienen mayor área bajo la curva (AUC). Tomada de (16).

Otros estudios del perfil bacteriano fecal en pacientes con TEA han demostrado una mayor abundancia del género *Clostridium*, que dan lugar a toxinas que pueden ser sobreexpresadas en el intestino del autista y alcanzar niveles sistémicos (18). Los individuos con TEA también mostraron una disminución en la relación de los filos *Bacteroidetes/ Firmicutes* y un aumento de las especies *Lactobacillus* y *Desulfovibrio* que está asociado con la gravedad de TEA (19). El nivel de gravedad está relacionado con la reducción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) que son modulados por estos microorganismos gastrointestinales (19). Los géneros importantes para la degradación y fermentación de carbohidratos, incluyendo *Prevotella*, *Coprococcus* y *Veillonellaceae* disminuyeron en pacientes con TEA, como se ha citado anteriormente (16, (20). Por otro lado los pacientes con TEA mostraron una elevada abundancia de *Sutterella*, que regula el metabolismo de la mucosa y la integridad epitelial (21). También se ha detectado una disminución en *Akkermansia* y un aumento en *Ruminococcus*, que son degradadores de la mucosa intestinal (21).

A pesar de estos informes de disbiosis microbiana en el TEA, hay poco consenso sobre especies bacterianas específicas que se alteren de manera similar en estudios diferentes. Es decir no se ha identificado ninguna línea microbiana definida para el TEA, aunque muchos estudios describen diferencias microbianas dentro de cohortes independientes de TEA y controles (11).

Cambios en el microbioma intestinal de niños autistas	
<i>Clostridium</i> ↑	Parracho HM, <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacteroidetes / Firmicutes</i> ↓ <i>Lactobacillus</i> y <i>Desulfovibrio</i> ↑	Tomova A, <i>et al</i> (2015)
<i>Prevotella</i> , <i>Coprococcus</i> y <i>Veillonellaceae</i> ↓	Williams BL, <i>et al</i> (2011) Kang DW, <i>et al</i> (2013)
<i>Sutterella</i> ↑ <i>Akkermansia</i> ↓ <i>Ruminococcus</i> ↑	Wang L, <i>et al</i> (2013)

- **Dieta materna en ratones, relacionada con déficits sociales y sinápticos inducidos en la descendencia**

Existe una creciente evidencia epidemiológica de que la obesidad materna aumenta el riesgo de desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos en la descendencia (19,(22).

En el año 2016 se llevó a cabo un estudio en el Baylor College of Medicine (Houston, Texas), para investigar como la obesidad inducida por la dieta materna afecta al desarrollo neurológico de la progenie (23). Conforme esto, se tomó un grupo de ratones hembra, y se dividieron en dos cohortes; Una cohorte fue alimentada con una dieta regular (MRD), mientras que la otra siguió una dieta rica en grasa (MHFD), durante 8 semanas (23), un tiempo estándar requerido para alcanzar un estado de obesidad inducido por la dieta en ratones (24). A continuación las hembras fueron emparejadas con machos para producir descendencia, una vez pasado el período de destete se les volvió a administrar una dieta regular (Fig 5 A).

Primero se evaluaron las interacciones sociales recíprocas registrando la cantidad de tiempo que un par de ratones, que no estaban familiarizados entre sí, pasaban interactuando en un campo neutral (Fig. 2 B). Cuando se comparó, la descendencia de MHFD tuvo menos interacciones recíprocas que la de MRD (Fig. 5C-5D). A continuación, se utilizó la prueba de tres cámaras (25), para evaluar la sociabilidad al comparar el tiempo que pasaban los ratones en una jaula de alambre vacía frente a una que contiene un ratón. También se estudió la preferencia por la novedad social midiendo el tiempo de los ratones pasaban interactuando con un familiar frente a un ratón desconocido (Fig. 5E).

En consonancia con los resultados de las interacciones sociales recíprocas, los descendientes de MHFD tuvieron una sociabilidad alterada y no mostraron preferencia por la novedad social, es decir, que no tuvieron mayor afinidad por interactuar con un ratón novel con respecto a un familiar (Fig. 5F-5G). Estos datos en conjunto indican que los descendientes de MHFD muestran déficits sociales (23).

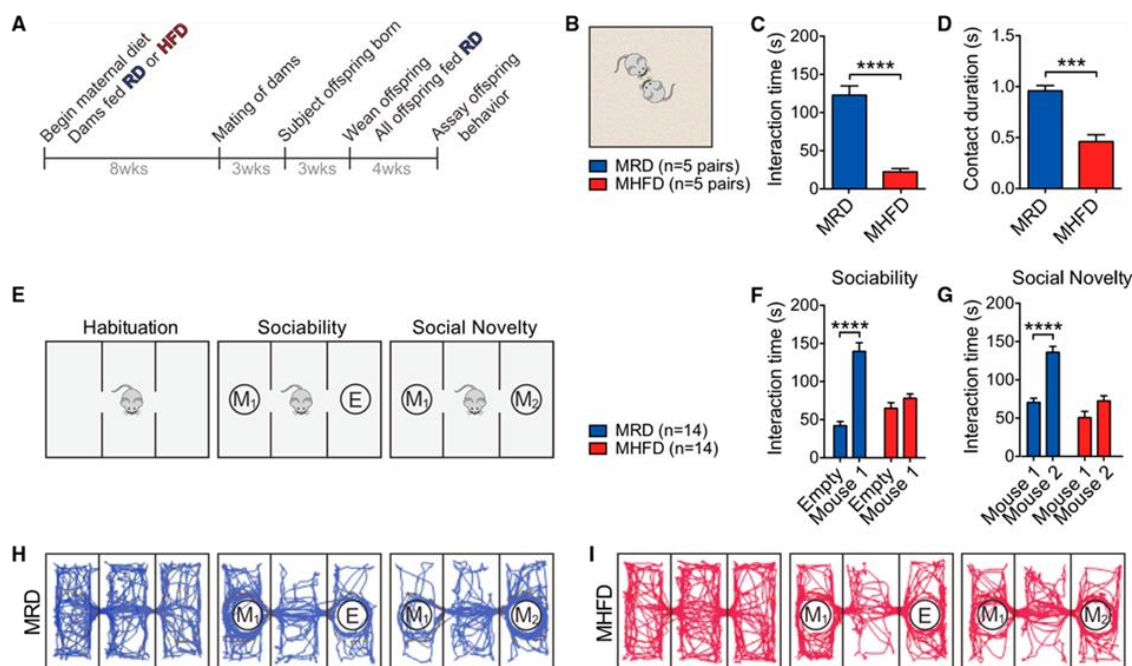


Figura 5. A) Esquema del régimen de la dieta materna y la cría. B) Esquema de interacción social recíproca. C) Tiempo de interacción ($p < 0,0001$, $t = 7,90$) D) Duración del contacto ($p < 0,001$, $t = 5,89$). E) Esquema de interacción social a través del experimento de tres cámaras. M1: Ratón conocido/ M2: Ratón desconocido/ E: Jaula vacía. F-G) Medida de sociabilidad y novedad social en la progenie de MRD y la de MHFD. H-I) Actividad exploratoria representativa de los descendientes de MRD (H) y MHFD (I) en la prueba de tres cámaras. Tomada de (23).

Para examinar si MHFD induce disbiosis en la microbiota intestinal de la descendencia, se analizó la composición bacteriana y la estructura de la comunidad en las heces de descendientes de MRD y MHFD, a través de la secuenciación de un gen codificante del ARN ribosomal 16 S. Las comunidades microbianas en ambos descendientes (MRD y MHFD), se compone de una microbiota típica de intestino del ratón, dominada por los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Por otra parte, la diversidad de la microbiota en la descendencia MHFD se redujo en comparación con la microbiota MR (23).

Para investigar qué especies bacterianas estaban ausentes en la microbiota de la descendencia de MHFD, se realizó una secuenciación metagenómica *shot gun* de muestras fecales de ambos descendientes (MHFD y MRD). El análisis identificó varias especies cuya abundancia relativa se redujo drásticamente en la microbiota descendiente de MHFD (Tabla 4). Entre estos, *Lactobacillus reuteri* fue el más destacado (9 veces

menos) en la población de microbiota MHFD comparada con la microbiota MRD (Tabla 4).

Species of Interest	MRD Representation	MHFD Representation	Fold Change MRD/MHFD
<i>Lactobacillus reuteri</i>	7.49 ± 3.0	0.879 ± 0.21	9.24 ± 0.65
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.00709 ± 0.0055	0.00126 ± 0.0011	5.63 ± 1.17
<i>Helicobacter hepaticus</i>	7.35 ± 2.4	2.58 ± 1.3	2.84 ± 0.61
<i>Bacteroides uniformis</i>	5.49 ± 2.2	2.07 ± 0.78	2.65 ± 0.56
<i>Olsenella unclassified</i>	0.230 ± 0.064	0.121 ± 0.031	1.90 ± 0.38
<i>Collinsella unclassified</i>	0.0866 ± 0.031	0.0494 ± 0.016	1.75 ± 0.48
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	19.4 ± 3.3	11.3 ± 2.4	1.71 ± 0.27
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	24.5 ± 6.2	17.1 ± 5.2	1.43 ± 0.40

Tabla 4. Especies cuya abundancia es reducida en la microbiota intestinal de los descendientes de MHD. Tomada de (21).

Se planteó la hipótesis de que la disminución selectiva de *L. reuteri* en la microbiota de la descendencia de MHFD estaba relacionada con sus déficits sociales. Para probar esta hipótesis, se introdujo por un lado *L. reuteri* muerto (controles) y por otro lado *L. reuteri* vivo (casos), en el agua potable de la descendencia de MHFD al destete, durante 4 semanas. Más tarde se midió su comportamiento (Fig 6A). Curiosamente, el tratamiento con *L. reuteri* vivo mejoró significativamente la sociabilidad y la preferencia por la novedad social en la descendencia de MHFD (Fig 6). Por el contrario, el tratamiento con *L. reuteri* no tuvo ningún efecto sobre la ansiedad en la descendencia de MHFD. Tomados en conjunto, estos datos indican que la reconstitución de *L. reuteri* rescata específicamente los endofenotipos sociales, pero no otros conductuales asociados con el TEA (23).

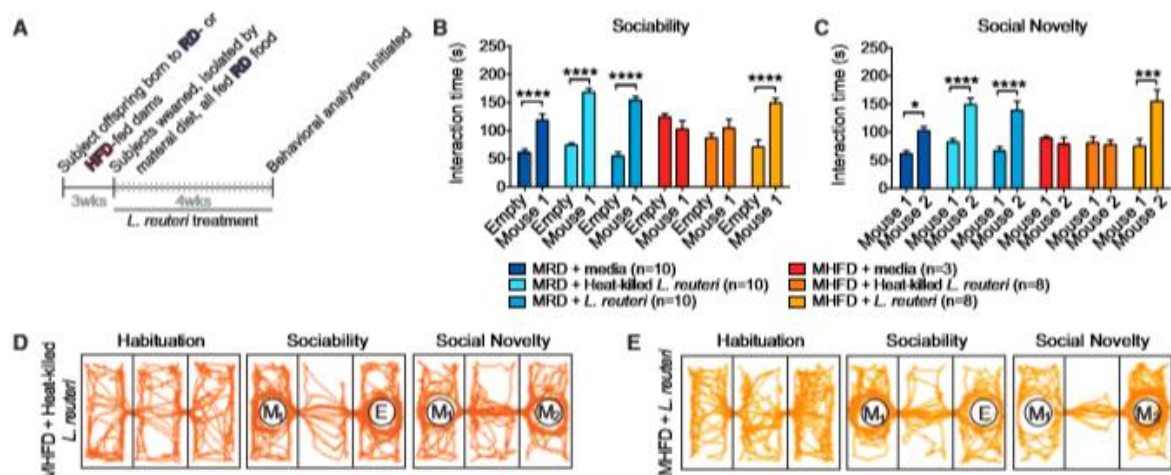


Figura 6. A) Esquema del tratamiento con *L. reuteri*. B y C) Medida de sociabilidad y novedad social en la progenie de MRD y la de MHFD tratados con *L.Reuteri* muerto y

L. Reuteri vivo. D y E) Actividad exploratoria representativa de los descendientes de MHFD tratados con *L. reuteri* muerto (naranja) y con *L. reuteri* vivo (amarillo). Tomada de (23).

Por otro lado, la interacción social induce la potenciación sináptica a largo plazo (LTP) en el área tegmental ventral (VTA) del cerebro. Además, se sabe que la oxitocina activa las neuronas VTA tanto en ratones como en seres humanos, influyendo en el procesamiento de señales socialmente relevantes (24, (26). Debido a que la oxitocina se sintetiza principalmente en los núcleos paraventriculares (PVN) del hipotálamo, se decidió comparar el número de células que expresan oxitocina en el PVN de los descendientes de MRD y MHFD. La descendencia de MHFD tenía significativamente menos neuronas inmunorreactivas de oxitocina en comparación con la descendencia de MRD. Se vio que en la progeñe de MHFD tratada con *L. reuteri*, el número de células que expresan oxitocina fue mayor que en la progeñe MHFD tratada con control. Por lo tanto, el número de neuronas inmunorreactivas de oxitocina en el PVN se reduce en descendientes de MHFD, pero puede ser restaurado por el tratamiento de *L. reuteri* (Fig.7)

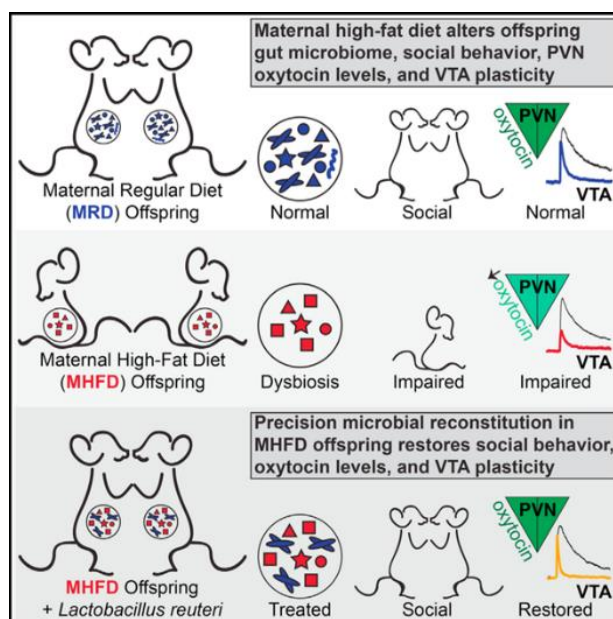


Figura 7. Resumen de la influencia de la dieta materna sobre el desarrollo de trastornos sociales deficitarios. Tomada de (23).

6. CONCLUSIONES

El autismo está estrechamente asociado con un microbioma intestinal diferente, caracterizado por una riqueza y diversidad menores, así como una composición y una

estructura microbiana alteradas. Existen varios estudios que revelan la composición del microbioma intestinal en niños autistas, el dato más significativo es la baja abundancia de los géneros *Prevotella*, *Coprococcus*, *Veillonellaceae* en niños autistas comparado con niños neurotípicos. Estos cambios microbianos están más relacionados con la presencia de síntomas autistas que con síntomas gastrointestinales graves. Aún así no existe una composición microbiana común en niños que sufren este tipo de trastornos. Estas discrepancias podrían estar justificadas por varios factores como la heterogeneidad de las cohortes estudiadas, la historia clínica, el estilo de vida, el tipo de dieta y la exposición a xenobióticos. Estos cambios microbianos están más relacionados con la presencia de síntomas autistas que con síntomas gastrointestinales graves.

También se muestran evidencias de que el tipo dieta materna puede influir directamente sobre el desarrollo de trastornos del desarrollo neurológico en la descendencia. Más concretamente, una dieta rica en grasa suministrada a ratones hembra dio lugar a progenitores con disbiosis microbiana y comportamientos sociales alterados. Este tipo de ensayo serviría como primer paso para aplicarse clínicamente en humanos y demostrar esta asociación.

En cuanto al tratamiento, el autismo no se caracteriza por la existencia de medicamentos que sean capaces de curar el TEA ni tratar los síntomas principales de este. Se ha visto que el uso de probióticos como *L.reuteri* en ratones con síntomas de TEA, puede reemplazar microorganismos ausentes y revertir ciertos comportamientos asociales que se dan en autismo. La aplicación de este tratamiento en ensayos en seres humanos puede conducir a nuevas formas de tratar los problemas fisiológicos y de comportamiento asociados a autismo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Mulle JG, Sharp WG, Cubells JF. The gut microbiome: a new frontier in autism research. *Curr Psychiatry Rep.* 2013;15(2):337.
2. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473(7346):174-80.
3. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science.* 2011;334(6052):105-8.
4. **Guarner F.** Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad Nutrición hospitalaria. 2007:14-9.
5. Qin J, Ruiqiang L, Arumugam M, Solvsten Burgdorf K, Manichanh C, Nielsen T, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 4 March 2010;464:59-65.

6. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312(5778):1355-9.
7. Kaplan JL, Shi HN, Walker WA. The role of microbes in developmental immunologic programming. *Pediatr Res*. 2011;69(6):465-72.
8. Zhu B, Wang X, Li L. Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell*. 2010;1(8):718-25.
9. Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*. 2005;26(8):447-54.
10. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005;122(1):107-18.
11. Vuong HE, Hsiao EY. Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry*. 2017;81(5):411-23.
12. Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, et al. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet*. 2014;46(8):881-5.
13. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*. 2005;57(1):67-81.
14. Emanuele E, Orsi P, Boso M, Broglia D, Brondino N, Barale F, et al. Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neurosci Lett*. 2010;471(3):162-5.
15. Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol*. 2011;11:22.
16. Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, et al. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One*. 2013;8(7):e68322.
17. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D141-5.
18. Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 10):987-91.
19. Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K, et al. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiol Behav*. 2015;138:179-87.
20. Williams BL, Hornig M, Buie T, Bauman ML, Cho Paik M, Wick I, et al. Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances. *PLoS One*. 2011;6(9):e24585.
21. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder. *Mol Autism*. 2013;4(1):42.
22. Galley JD, Bailey M, Kamp Dush C, Schoppe-Sullivan S, Christian LM. Maternal obesity is associated with alterations in the gut microbiome in toddlers. *PLoS One*. 2014;9(11):e113026.
23. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*. 2016;165(7):1762-75.
24. Aye IL, Rosario FJ, Powell TL, Jansson T. Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(41):12858-63.
25. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(7):490-502.
26. Tang Y, Chen Z, Tao H, Li C, Zhang X, Tang A, et al. Oxytocin activation of neurons in ventral tegmental area and interfascicular nucleus of mouse midbrain. *Neuropharmacology*. 2014;77:277-84.

